

549,886

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
30. September 2004 (30.09.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/082840 A1

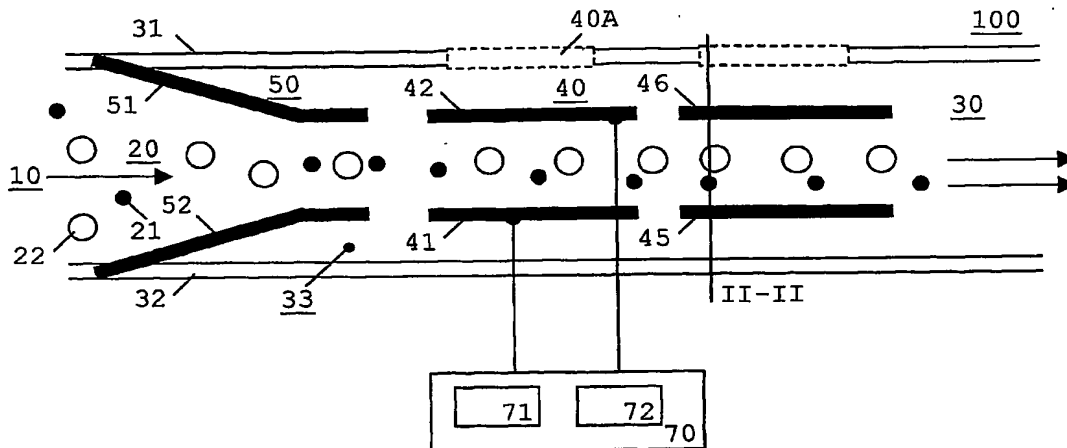
(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **B03C 5/00**
(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP2004/002774**
(22) Internationales Anmeldedatum:
17. März 2004 (17.03.2004)
(25) Einreichungssprache: **Deutsch**
(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**
(30) Angaben zur Priorität:
103 11 716.4 17. März 2003 (17.03.2003) **DE**
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **EVOTEC OAI AG [DE/DE]; Schnackenburgallee**
114, 22525 Hamburg (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **MÜLLER, Torsten**
[DE/DE]; Harriegelstrasse 39, 12439 Berlin (DE).
SCHNELLE, Thomas [DE/DE]; Koppenstrasse 65,
10243 Berlin (DE). **HAGEDORN, Rolf [DE/DE];**
Wartiner Str. 16, 13057 Berlin (DE).
(74) **Anwalt: HERTZ, Oliver; V. Bezold & Sozien,**
Akademiestrasse 7, 80799 München (DE).
(81) **Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für**
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHODS AND DEVICES FOR SEPARATING PARTICLES IN A LIQUID FLOW

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR TRENNUNG VON PARTIKELN IN EINER FLÜSSIGKEITS-
STRÖMUNG



(57) Abstract: The invention relates to methods and devices for separating particles (20, 21, 22) in a compartment (30) of a fluidic microsystem (100). According to the invention, a liquid (10) in which particles (20, 21, 22) are suspended is displaced in a pre-determined flow direction through the compartment (30), and a deviating potential is generated, causing at least part of the particles (20, 21, 22) to be displaced in a deviated direction in relation to the liquid. Furthermore, at least one focussing potential is generated, such that, under the effect of high-frequency electrical fields, at least part of the particles is displaced by dielectrophoresis, in the opposite direction to the deviated direction in relation to the liquid. Particles with different electric, magnetic or geometric properties are guided in different flow regions in the liquid.

(57) Zusammenfassung: Es werden Verfahren und Vorrichtungen zur Trennung von Partikeln (20, 21, 22) in einem Kompartiment (30) eines fluidischen Mikrosystems (100) beschrieben, bei denen die Bewegung einer Flüssigkeit (10), in der Partikel (20, 21, 22) suspendiert sind, mit einer vorbestimmten Strömungsrichtung durch das Kompartiment (30), und die Erzeugung eines ablenkenden Potentials, in dem mindestens ein Teil der Partikel (20, 21, 22) relativ zur Flüssigkeit in eine Ablenkrichtung bewegt wird, vorgesehen sind, wobei ferner mindestens ein

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2004/082840 A1



MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

- (84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

fokussierendes Potential erzeugt wird, so dass unter der Wirkung von hochfrequenten elektrischen Feldern mindestens ein Teil der Partikel relativ zur Flüssigkeit durch Dielektrophorese entgegengesetzt zur Ablenkrichtung bewegt wird, und eine Lenkung von Partikeln mit verschiedenen elektrischen, magnetischen oder geometrischen Eigenschaften in verschiedene Strömungsbereiche in der Flüssigkeit erfolgt.

Verfahren und Vorrichtung zur Trennung von Partikeln in
einer Flüssigkeitsströmung

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Trennung von Partikeln in einem fluidischen Mikrosystem, insbesondere unter der Wirkung von Elektrophorese, und fluidische Mikrosysteme, die zur Durchführung derartiger Verfahren eingerichtet sind.

In der biomedizinischen und chemisch-analytischen Technik gewinnen die Trennung von Mikroobjekten, wie z. B. Partikeln natürlichen oder synthetischen Ursprungs oder Molekülen in fluidischen Mikrosystemen unter der Wirkung elektrisch oder magnetisch induzierter Kräfte zunehmend an Bedeutung. Zwei herkömmliche Trennprinzipien, die sich grundsätzlich nach der Art der elektrischen Trennkräfte unterscheiden, sind schematisch in den Figuren 10A, B illustriert.

Figur 10A zeigt schematisch die Trennung mittels negativer Dielektrophorese (siehe z. B. DE 198 59 459). In einem fluidischen Mikrosystem 100' strömen Partikel mit verschiedenen dielektrischen Eigenschaften durch einen ersten Kanal 30'. Mit einer Elektrodenanordnung 40' wird durch Beaufschlagung mit hochfrequenten elektrischen Feldern eine sich quer über den Kanal 30' erstreckende Feldbarriere erzeugt, die je nach den dielektrischen Eigenschaften der Partikel durchlässig oder in Zusammenarbeit mit den Strömungskräften seitlich ablenkend wirkt. Partikel 22' mit einer im Vergleich zum Medium niedrigen Dielektrizitätskonstante (bzw. Leitfähigkeit) werden in einen benachbarten Kanal 30A' abgelenkt, während Partikel 21' mit einer höheren Dielektrizitätskonstante (bzw. Leitfähigkeit) im Kanal 30' weiterströmen. Da die Dielektrophorese von der Partikelgröße abhängt (siehe T. Schnelle et al. in "Naturwissenschaften" Bd. 83, 1996, S. 172-176), kann sogar bei gleichen dielektri-

schen Eigenschaften eine Trennung der Partikel nach der Größe erfolgen. Die herkömmliche dielektrophoretische Partikeltrennung kann Nachteile in Bezug auf die Zuverlässigkeit der Trennung, insbesondere bei Partikeln mit ähnlichen Dielektrizitätskonstanten und die Komplexität des Kanalaufbaus besitzen. Die Zuverlässigkeit der Trennung kann insbesondere bei der Trennung biologischer Zellen gleichen Typs in verschiedene Subtypen (z. B. Makrophagen, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten) beschränkt sein.

Ein weiteres, bei der herkömmlichen dielektrophoretischen Partikeltrennung nur beschränkt gelöstes Problem kann durch das Auftreten von unerwünschten Zellbestandteilen in biologischen Suspensionsproben gegeben sein. Zellbestandteile können häufig allein durch ihre dielektrophoretischen Eigenschaften nicht von kompletten Zellen unterschieden werden. Des Weiteren können sie in Mikrosystemen zu unerwünschten Ansammlungen an Kanalverengungen und zu Verstopfungen bis hin zum Systemausfall führen. Schließlich können sich unerwünschte Zellbestandteile auch störend auf Messungen an Zellen, wie zum Beispiel auf eine patch-clamp-Messung auswirken. Es besteht daher ein Interesse an einem verbesserten Verfahren zur Reinigung von Suspensionsproben, das eine höhere Zuverlässigkeit als die dielektrophoretische Partikeltrennung besitzt.

Figur 10B illustriert eine elektrophoretische Trennung von Partikeln, z. B. Molekülen in einem mikrostrukturierten Kanal (siehe T. Pfohl et al. in "Physik Journal", Bd. 2, 2003, Seite 35-40). An den Enden des abwechselnd mit breiten und schmalen Abschnitten gebildeten Kanals 30' sind Elektroden 41', 42' angeordnet, die bei Beaufschlagung mit einer Gleichspannung im Kanal 30' ein Elektrophoresefeld bilden. Die Driftgeschwindigkeit der Moleküle im Elektrophoresefeld hängt von deren Molekulargewicht und Ladung ab. In den breiteren Abschnitten des Kanals 30' ist die Driftgeschwindigkeit der größeren Moleküle ge-

ringer, so dass im Lauf der Trennung zunächst die kleinen Moleküle und später die großen Moleküle am Ende der Trennstrecke ankommen. Die elektrophoretische Trennung in fluidischen Mikrosystemen besitzt zwar den Vorteil, dass auf die Verwendung eines Trenngels wie bei der makroskopischen Elektrophorese verzichtet werden kann. Das in Figur 10B gezeigte Prinzip besitzt jedoch den Nachteil, dass für jede Trennaufgabe und insbesondere jede Partikelart ein gesondertes Mikrosystem mit angepassten geometrischen Parametern bereitgestellt werden muss. Nachteilig ist auch, dass die Trennung in der ruhenden Flüssigkeit erfolgt, weil dies mit einem hohen Zeitaufwand und zusätzlichen Maßnahmen zur Anpassung an Durchflusssysteme verbunden ist.

Die oben genannten Trennprinzipien werden auch in WO 98/10267 erwähnt. Im Kanal eines fluidischen Mikrosystems werden geladene Partikel z. B. elektrophoretisch aus einer Probe in eine parallel strömende Pufferlösung gezogen. Diese Technik ist auf Proben mit bestimmten Eigenschaften der Probenbestandteile beschränkt. Sie ist ferner nachteilig, da die Partikel elektrophoretisch an die Kanalwände gezogen werden können, was insbesondere bei biologischen Materialien, z. B. Zellen unerwünscht ist.

Die elektrophoretische Ablenkung von Partikeln wird auch in DE 41 27 405 beschrieben. Partikel werden in einer ruhenden Flüssigkeit unter der Wirkung von elektrischen Wanderwellen bewegt. Wenn sie bei der Bewegung an Elektrophorese-Elektroden vorbeitreten, erfolgt eine Trennung nach den elektrischen Eigenschaften der Partikel. Es ergeben sich die gleichen Nachteile wie bei der o. g. WO 98/10267.

Es ist auch bekannt, dielektrophoretische und elektrophoretische Feldwirkungen bei der Manipulation von Partikeln in fluidischen Mikrosystemen zu kombinieren. Gemäß DE 195 00 683 werden flüssigkeitssuspendierte Partikel in einer Elektrodenanord-

nung gehalten, die bei Beaufschlagung mit hochfrequenten Wechselspannungen durch negative Dielektrophorese einen geschlossenen Feldkäfig (Potentialtopf) bildet. Um bei Präzisionsmessungen Positionsvariationen durch thermische Stöße zu korrigieren, werden Partikel im Feldkäfig zusätzlich elektrophoretisch verschoben. Die elektrophoretische Verschiebung erfolgt im Rahmen eines Regelkreises je nach den beispielsweise optisch festgestellten Positionsvariationen des Partikels. Die in DE 195 00 683 beschriebene Technik ist zur Partikeltrennung nicht geeignet, da sie ein geschlossenes, stationäres Messsystem darstellt. Des Weiteren ist die Kombination von Dielektrophorese und Elektrophorese am geschlossenen Feldkäfig auf relativ große, einzelne Partikel beschränkt. Nachteile können sich bei der Vermessung beispielsweise von Makromolekülen ergeben, da bei diesen die Wirkung der negativen Dielektrophorese deutlich geringer als die der Elektrophorese ist, so dass es zu einer unerwünschten Anlagerung der Makromoleküle an den Elektroden kommen kann. Partikelgruppen lassen sich mit dieser Technik nicht vermessen, da alle Partikel eine eigene Korrekturbewegung erfordern. Eine Trennung von Partikeln wäre auch durch einen Dipol-Dipol-Effekt erschwert (siehe T. Schnelle et al. in "Naturwissenschaften" Bd. 83, 1996, S. 172-176), durch den eine Teilchenaggregation gefördert wird.

Aus DE 198 59 459 ist auch die Kombination von Wechsel- und Gleichspannungen in fluidischen Mikrosystemen zur gezielten Zellfusion oder -poration bekannt. Bei dieser Technik ist die Wirkung der Gleichspannung auf die Fusion oder Poration beschränkt, eine Partikeltrennung ist nicht vorgesehen.

Aus der Publikation von S. Fiedler et al. in "Anal Chem." Bd. 67, 1995, S. 820-828, ist bekannt, durch eine ggf. gepulste Gleichspannungs-Ansteuerung von Mikroelektroden in wässrigen Elektrolytlösungen zeitliche oder lokale, mit Fluoreszenzfarbstoffen nachweisbare pH-Gradienten zu generieren.

Für die pharmakologische, analytische und biotechnologische Forschung besteht nicht nur ein Interesse an einer Trennung von Partikelgemischen nach geometrischen (Größe, Form) oder elektrischen Eigenschaften (Dielektrizitätskonstante, Leitfähigkeit), sondern auch nach anderen Parametern, wie z. B. Oberflächenladungen oder Ladungs-Volumen-Verhältnissen. Das Auftreten von Oberflächenladungen wird beispielsweise von N. Arnold et al. in "J. Phys. Chem." Bd. 91, 1987, S. 5093 - 5098, L. Gorretalini et al. in "Phys. Rev. E" Bd. 56, 1997, S. 2025-2034 und Maier et al. in "Biophysical J." Bd. 73, 1997, S. 1617-1626 beschrieben.

Die Aufgabe der Erfindung ist es, verbesserte Verfahren zur Trennung von Partikeln in Flüssigkeitsströmungen in fluidischen Mikrosystemen bereitzustellen, mit denen die Nachteile herkömmlicher Techniken vermieden werden. Erfindungsgemäße Verfahren sollen sich insbesondere durch einen erweiterten Anwendungsbereich bei einer Vielzahl verschiedener Partikel und eine erhöhte Zuverlässigkeit bei der Partikeltrennung auszeichnen. Die Aufgabe der Erfindung ist es auch, verbesserte Mikrosysteme zur Umsetzung derartiger Verfahren, insbesondere verbesserte mikrofluidische Trenneinrichtungen bereitzustellen, die sich durch einen vereinfachten Aufbau, eine hohe Zuverlässigkeit, eine vereinfachte Steuerung und einen breiten Anwendungsbereich bei verschiedenartigen Partikeln auszeichnen.

Diese Aufgaben werden durch Verfahren und Vorrichtungen mit den Merkmalen der Patentansprüche 1 und 21 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Anwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Die vorliegende Erfindung basiert verfahrens- und vorrichtungsbezogen auf der allgemeinen technischen Lehre, mindestens einen, in einer Flüssigkeit suspendierten Partikel durch eine

kombinierte Ausübung von Trennkräften, die einerseits fokussierende dielektrophoretische Trennkräfte und andererseits ablenkende Trennkräfte, wie zum Beispiel elektrophoretische Trennkräfte umfassen, im Zustand eines kontinuierlichen Flusses innerhalb der Flüssigkeit, also relativ zur strömenden Flüssigkeit zu verschieben. Der mindestens eine Partikel kann während des Vorbeitritts an mindestens einer Trenneinrichtung im fluidischen Mikrosystem je nach seinen geometrischen, elektrischen, magnetischen oder davon abgeleiteten Eigenschaften in einen bestimmten Strömungsbereich gelenkt werden. Je nach Ausrichtung der ablenkenden Trennkräfte (Ablenkrichtung) relativ zur Bewegungsrichtung der Flüssigkeit (Strömungsrichtung) kann der Strömungsbereich einen bestimmten Strömungspfad innerhalb des Strömungsquerschnittes der Flüssigkeit oder einen in Strömungsrichtung vorderen oder hinteren Abschnitt der Strömung umfassen.

Die Bewegung des Partikels in einen bestimmten Strömungsbereich ermöglicht eine Trennung von Partikelgemischen während des kontinuierlichen Flusses der Partikelsuspension zum Beispiel durch eine Gruppe von mehreren Elektroden. Die Trennwirkung basiert auf der spezifischen Reaktion verschiedener Partikel auf die verschiedenen ablenkenden und fokussierenden Feldwirkungen. Im Gegensatz zur Trennung an Feldbarrieren kann eine Trennstrecke durchlaufen werden, wodurch die Zuverlässigkeit der gezielten Bewegung einzelner Partikel zum Beispiel auf bestimmte, vorzugsweise zwei Strömungspfade erhöht werden kann. Die Wirkung der elektrischen Felder kann durch Einstellung der Feldeigenschaften (insbesondere Frequenz, Spannungsamplituden, Takt usw.) auf die Parameter der zu trennenden Partikel abgestimmt werden. Die Erfindung ermöglicht einen vereinfachten Aufbau der elektrophoretischen Trenneinrichtung, da keine Gele zur Einbettung von Elektrophorese-Elektroden oder besondere Kanalformen benötigt werden. Des Weiteren kann eine Gasbildung durch geeignete Ansteuerung der Elektroden in Kombination mit der perma-

nenten Strömung vermieden werden. Die Erfindung besitzt ferner Vorteile insbesondere in Bezug auf die Zuverlässigkeit und Trennschärfe bei der Partikeltrennung in verschiedene Strömungspfade und eine hohe Effektivität und einen hohen Durchsatz der Trennung.

Erfindungsgemäß wird eine Trennung von Partikeln in einem Kompartiment, insbesondere einem Kanal eines fluidischen Mikrosystems, durch das Partikel im suspendierten Zustand strömen, wobei wenigstens ein Teil der Partikel oder Partikel von mindestens einem Typ unter der Wirkung eines ablenkenden Potentials aus der zu trennenden Probe in eine vorbestimmte Ablenkrichtung (erste Bezugsrichtung, zum Beispiel zum Rand des Kompartiments) bewegt werden, dahingehend weiterentwickelt, dass gleichzeitig oder zeitlich und/oder räumlich alternierend unter der Wirkung eines entgegengesetzten Potentials durch Dielektrophorese, insbesondere negative oder positive Dielektrophorese eine entgegengesetzte Bewegung der Partikel (zweite Bezugsrichtung, zum Beispiel weg von den Wänden oder als Sammlung in der Kanalmitte) erfolgt. Vorteilhafterweise erfahren Partikel mit verschiedenen elektrischen, magnetischen oder geometrischen Eigenschaften die Potentialwirkungen als Trennkräfte in verschiedener Weise, so dass sich durch die kombinierte Ausübung der Potentiale verschiedene effektive Kräfte (Potentialminima) bilden, zu denen die Partikel wandern. Die Potentialminima sind z. B. im Strömungsquerschnitt der Flüssigkeit beabstandet, so dass eine Trennung in der Strömung auf verschiedene Strömungspfade möglich ist. Das fokussierende, dielektrophoretisch wirkende Potential ist vorzugsweise hin zur Kanalmitte wirkend gebildet. Wenn im Kanalquerschnitt die Elektroden im wesentlichen auf einer Kreislinie angeordnet sind, kann das fokussierende Potential in Bezug auf die Strömungsrichtung im Kanal vorteilhafterweise radialsymmetrisch gebildet sein.

Die mit der erfindungsgemäßen Technik vorzugsweise voneinander getrennten oder separierten Partikel umfassen allgemein kolloidale oder einzelne Partikel mit einem Durchmesser von z. B. 1 nm bis 100 μm . Es können synthetische Partikel (z. B. Latex-beads, superparamagnetische Partikel, Vesikeln), biologische Partikel (z. B. Zellgruppen, Zellbestandteile, Zelltrümmer, Organellen, Viren) und/oder hybride Partikel, die aus synthetischen und biologischen, unterschiedlichen synthetischen oder unterschiedlichen biologischen Partikeln aufgebaut sind, den erfindungsgemäßen Trennverfahren unterzogen werden.

Vorteilhafterweise hängt die elektrophoretische Beweglichkeit μ ($\mathbf{v} = \mu \cdot \mathbf{E}$) für Zellen nicht nur von der Zusammensetzung des äußeren Mediums, also der Suspensionsflüssigkeit (insbesondere Leitfähigkeit, Ionenzusammensetzung, z. B. Ca^{2+} -Gehalt und pH-Wert), sondern auch vom Zelltyp ab, so dass sich mit der erfindungsgemäßen Technik innerhalb einer Zellgruppe verschiedene Zelltypen oder innerhalb von einer Zellgruppe gleicher Zelltypen verschiedene Subtypen (z. B. Makrophagen, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten) unterscheiden lassen. Die Unterscheidung der Subtypen stellt einen besonderen Vorteil der Erfindung dar, da diese mit herkömmlichen dielektrophoretischen Trennverfahren nur schlecht unterscheidbar sind. Durch die Kombination einer dielektrophoretischen Fokussierung gemäß der Erfindung wird die Trennschärfe insbesondere für Zellen von gleichem Typ erhöht.

Wenn die zu trennenden Partikel eine Mischung aus biologischen Zellen und Zellbestandteilen, wie z. B. Zelltrümmern umfasst, kann das Trennverfahren vorteilhafterweise für eine Reinigung einer Suspensionsprobe mit suspendiertem biologischem Material verwendet werden. Das Material, das bspw. nach einer Kultivierung inhomogen zusammengesetzt ist und bspw. vollständige Zellen, tote Zellen, lebende Zellen oder Bruchstücke von Zellen, wie z. B. Organellen, Zellreste oder Proteinklumpen umfasst, kann mit dem erfindungsgemäßen Verfahren gereinigt werden. Die

unerwünschten Bruchstücke von Zellen können über bestimmte Strömungspfade aus dem Mikrosystem abgeführt werden. Ein nachteiliger Einfluss auf folgende Strukturelemente im Mikrosystem, wie z. B. ein Verstopfen von Kanälen durch Zellbestandteile kann vermieden werden.

Vorteilhafterweise kann das ablenkende Potential durch elektrische, magnetische, optische, thermische und/oder mechanische Kräfte erzeugt und damit an die verschiedensten Anwendungen und Partikelarten angepasst werden. Mechanische Kräfte umfassen zum Beispiel Kräfte, die durch Schall, zusätzliche Strömungen oder Massenträgheit übertragen werden. Das ablenkende Potential kann insbesondere durch ein Gravitationsfeld gegeben sein, wobei erfindungsgemäß die Bewegung der Partikel im fokussierenden Potential (durch hochfrequente elektrische Felder) mit einer Sedimentationsbewegung der Partikel überlagert werden.

Wenn gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung die ablenkenden Trennkräfte elektrische Kräfte umfassen, unter deren Wirkung die Partikel durch Elektrophorese aus der Flüssigkeit hin zu deren Rand gezogen werden, können sich Vorteile in Bezug auf das Trennergebnis ergeben. Die Kombination von Elektrophorese und Dielektrophorese zur Partikeltrennung kann insbesondere Vorteile bei der Trennung biologischer Materialien besitzen, die zum Beispiel je nach Material oder Partikelgröße sehr verschieden auf Elektrophorese und Dielektrophorese reagieren und daher mit hoher Trennschärfe zu trennen sind.

Vorteilhafterweise können die Gleichspannungsfelder für die elektrophoretische Partikelbewegung gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung zusätzlich für eine elektrische Behandlung der Partikel verwendet werden. Es ist bekannt, dass biologische Zellen in statischen elektrischen Feldern lysiert werden können. Die Lyse umfasst eine elektrisch induzierte Veränderung, zum Beispiel Zerstörung der Zellen. Die Lyse dient

bspw. der Vorbereitung von Zellmaterial für PCR-Verfahren. Da die Wirkung der Lyse feldstärkeabhängig ist, ist gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung vorgesehen, dass bestimmte Zellen aus einem Zellgemisch durch die Elektrophorese in einen Strömungsbereich nahe den Elektroden abgelenkt werden, wo aufgrund des geringeren Abstandes von den Elektroden die Feldstärke höher ist und damit die Lyse gleichzeitig zum Vorgang der Partikeltrennung erfolgt.

Die Trennschärfe kann weiterhin flexibel durch eine geeignete Wechselspannungs-Steuerung eingestellt werden. Durch Änderung der Phasenlage von Feldern kann bei negativer Dielektrophorese das dielektrische Potential verschieden ausgeformt werden. Zusätzlich können durch die Gleichspannungs-Ansteuerung pH-Profile aufgeprägt werden, die das elektrophoretisch oder dielektrisch wirksame Potential beeinflussen.

Bei der erfindungsgemäßen Kombination von Elektrophorese und Dielektrophorese können die Trenneinrichtungen zur Erzeugung der gegenläufigen Potentiale vorteilhafterweise durch eine gemeinsame Einheit gebildet werden. Die Trenneinrichtung umfasst Elektroden, die an Wänden des Kanals angeordnet sind und die mit elektrischen Feldern zur Erzeugung der Dielektrophorese und der Elektrophorese beaufschlagt werden. Vorteile für die Steuerung der Trennung können sich insbesondere ergeben, wenn die elektrischen Felder hochfrequente Wechselspannungsanteile und Gleichspannungsanteile umfassen, die gleichzeitig oder alternierend erzeugt werden.

Gemäß einer abgewandelten Variante der Erfindung können die ablenkenden Trennkräfte elektrische Kräfte umfassen, die wie das fokussierende Potential durch hochfrequente elektrische Felder erzeugt werden. Die Ablenkung kann somit ebenfalls durch geeignete gebildete dielektrophoretische Kräfte erzeugt werden, in-

dem hochfrequente elektrische Signale, z. B. Sinus- oder Rechtecksignale mit geeigneten Frequenzanteilen überlagert werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung können die ablenkenden und fokussierenden Potentiale zeitlich abwechselnd in mindestens einem Abschnitt des Kanals gebildet werden. Im zeitlichen Mittel wirkt auf die Partikel effektiv ein Potential, das der Superposition beider Potentiale entspricht. Vorteilhafterweise kann damit die Ansteuerung der mindestens einen Trenneinrichtung vereinfacht werden.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung können die beiden Potentiale abwechselnd in verschiedenen, aufeinander folgenden Abschnitten des Kanals erzeugt werden. Vorteilhafterweise kann damit der Aufbau des Mikrosystems vereinfacht werden.

Besonders vorteilhaft für die Erhaltung des Trennergebnisses kann es sein, wenn die Strömungspfade in weitere, getrennte Kompartimente des Mikrosystems münden. Wenn die getrennten Fraktionen in die sich anschließenden Kompartimente eingeströmt sind, ist eine nachträgliche Durchmischung ausgeschlossen. Besonders wirksam kann diese Trennung der Fraktionen sein, wenn die Kompartimente durch Kanalwände oder elektrische Feldbarrieren voneinander getrennt werden.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann vorgesehen sein, dass in den Kompartimenten eine weitere Trennung nach dem erfindungsgemäßen Prinzip, zum Beispiel eine kombinierte Ausübung von elektrophoretischer und dielektrophoretischer Feldwirkung erfolgt. Damit können vorteilhafterweise hierarchische Trennprinzipien mit einer Trennung in Grob- und nachfolgend in Feinfraktionen realisiert werden. Die Abfolge mehrerer Trennvorgänge nach Art einer Kaskade in verschiedene Fraktionen ist allerdings nicht zwingend an die Bereitstellung

der getrennten Kompartimente gebunden. Vielmehr ist die Realisierung der Trennkaskade mit Strömungspfaden in einem gemeinsamen, genügend breiten Kanal des Mikrosystems möglich.

Gemäß einer Abwandlung der Erfindung kann die Strömung im Mikrosystem so gelenkt werden, dass Partikel mehrfach eine Trennstufe durchlaufen, so dass vorteilhafterweise das Trennergebnis noch verbessert werden kann.

Weitere Vorteile der Erfindung können sich ergeben, wenn nach der Trennung (Ablenkung in verschiedene Strömungsbereiche) eine Detektion in den Strömungsbereichen zur Überprüfung des Trennergebnisses erfolgt. Die Detektion umfasst bspw. eine an sich bekannte optische Messung (Fluoreszenzmessung oder Durchlichtmessung) oder eine an sich bekannte Impedanzmessung.

Vorteilhafterweise können in Abhängigkeit vom Messergebnis, z. B. in Abhängigkeit von der Trennqualität oder auftretenden Fehltrennungen die Steuerparameter der ablenkenden und fokussierenden Potentiale so verstellt werden, dass sich die Trennwirkung verbessert.

Die Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Trennung kann vorteilhafterweise erhöht werden, wenn die Partikel zuerst an einem dielektrophoretischen oder hydrodynamischen Aufreihement vorbeitreten. An diesem werden einzelne Partikel oder eine Gruppe von Partikeln auf einem bestimmten Strömungspfad aufgereiht, auf dem sie an den Trenneinrichtungen, zum Beispiel den Elektroden zur Ausübung der Dielektrophorese und Elektrophorese vorbeitreten.

Wenn gemäß einer weiteren Variante der Erfindung im Kanal des Mikrosystems, in dem die Partikeltrennung erfolgt, ein pH-Gradient erzeugt wird, können sich Vorteile für die Trennwirkung ergeben. Durch den pH-Gradienten wird die Wirkung des ab-

lenkenden Potentials, wie z. B. die elektrophoretische Zellpartikelbewegung ortsabhängig. Dies ermöglicht eine Partikelablenkung in verschiedene Strömungspfade in Abhängigkeit von der Partikelposition entlang der Strömungsrichtung durch den Kanal. Vorteilhafterweise ergibt sich ein besonders einfacher Aufbau des Mikrosystems, wenn der pH-Gradient elektrochemisch unter Verwendung der Elektroden erzeugt wird, die auch zur Bildung des Gleichspannungsfeldes für die Elektrophorese verwendet werden.

Ein weiterer Vorteil der Erfindung besteht darin, dass die Partikeltrennung gleichzeitig in mehreren Raumrichtungen erfolgen kann. Erfindungsgemäß können mehrere ablenkende Potentiale mit verschiedenen Wirkrichtungen mit dem fokussierendem Potential, das dann vorzugsweise hin zur Kanalmitte wirkend gebildet ist, erzeugt werden, um die zu trennenden Partikel gleichzeitig in Bezug auf zwei verschiedene Merkmale, wie z. B. dielektrische und magnetische Eigenschaften zu trennen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein fluidisches Mikrosystem, das zur Umsetzung der erfindungsgemäßen Verfahren eingerichtet ist und insbesondere mindestens eine Trenneinrichtung zur Ausübung fokussierender dielektrophoretischer Trennkräfte und ablenkender Trennkräfte umfasst. Ein fluidisches Mikrosystem mit mindestens einem Kompartiment, zum Beispiel Kanal zur Aufnahme einer strömenden Flüssigkeit mit suspendierten Partikeln und einer ersten Trenneinrichtung zur Erzeugung eines ablenkenden, die Partikel in die erste Bezugsrichtung, zum Beispiel aus der Mitte der Strömung ziehenden Potentials wird insbesondere mit einer zweiten Trenneinrichtung ausgestattet, die zur Erzeugung mindestens eines fokussierenden, entgegengesetzten Potentials eingerichtet ist. Unter der Wirkung von hochfrequenten elektrischen Feldern werden die Partikel mit der zweiten Trenneinrichtung durch Dielektrophorese von den seitlichen

Wänden des Kanals und/oder darauf angeordneten Elektroden oder anderen Teilen von Trenneinrichtungen abgestoßen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die erste Trenneinrichtung zur Erzeugung elektrischer, magnetischer, optischer und/oder mechanischer Kräfte eingerichtet. Sie umfasst beispielsweise eine Elektrodeneinrichtung mit Elektroden oder Elektrodenabschnitten und bildet in diesem Fall mit der zweiten Trenneinrichtung eine gemeinsame Ablenkeinheit. Alternativ umfasst die erste Trenneinrichtung eine Magnetfeldeinrichtung, einen Laser oder eine Ultraschallquelle. Diese Komponenten werden erfindungsgemäß erstmalig zur Trennung strömender Partikel mit einer dielektrophoretischen Manipulation kombiniert.

Wenn die Trenneinrichtungen eine gemeinsame Ablenkeinheit bilden, ergibt sich vorteilhafterweise ein vereinfachter Aufbau des Mikrosystems. Die Ablenkeinheit umfasst vorzugsweise Elektroden, die wie an sich bekannte Mikroelektroden in fluidischen Mikrosystemen aufgebaut sind. Die Elektroden können zeitlich abwechselnd ansteuerbar sein.

Die Elektroden zur kombinierten Dielektrophorese und Elektrophorese sind vorzugsweise an Innenseiten der Wände des Kompartiments angeordnet. Bei dieser Gestaltung können sich Vorteile in Bezug auf die Effektivität der Feldwirkung ergeben.

Da die Trenneinrichtungen gleichzeitig oder zeitlich und/oder räumlich alternierend wirken können, so dass Partikel je nach den im zeitlichen Mittel wirkenden, effektiven Potentialen auf verschiedene Strömungspfade gelenkt werden, ist es vorteilhafterweise möglich, dass die ersten und zweiten Trenneinrichtungen getrennt in verschiedenen, aufeinander folgenden Abschnitten des Kompartiments angeordnet sind. Die Trenneinrichtungen

umfassen beispielsweise Elektrodenabschnitte, die jeweils zur Dielektrophorese oder Elektrophorese ansteuerbar sind.

Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung werden im Folgenden unter Bezug auf die beigefügten Zeichnungen beschrieben. Es zeigen:

Figur 1: eine schematische Draufsicht auf eine erste Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Mikrosystems (Ausschnitt),

Figur 2: eine Querschnittansicht des Mikrosystems gemäß Figur 1 entlang der Linie II-II,

Figur 3: eine Querschnittansicht des Mikrosystems mit schematisch illustrierten Potentialverhältnissen,

Figuren 4 bis 7: schematische Draufsichten auf weitere Ausführungsformen erfindungsgemäßer Mikrosysteme (Ausschnitt), und

Figur 8: eine schematische Querschnittsansicht einer Elektrodenanordnung zur Illustration einer Ausführungsform der Erfindung, bei der mehrere ablenkende Potentiale erzeugt werden,

Figur 9: eine Kurvendarstellung zur Erklärung der Erzeugung eines ablenkenden Potentials durch die Überlagerung dielektrophoretischer Kräfte,

Figuren 10A, B: schematische Illustrationen herkömmlicher Mikrosysteme mit einer dielektrophoretischen (A) und einer elektrophoretischen (B) Trennung.

Die Erfindung wird im Folgenden unter Bezug auf die Trennung von Partikeln im Kanal eines fluidischen Mikrosystems beschrieben. Fluidische Mikrosysteme sind an sich bekannt und werden daher mit weiteren Einzelheiten nicht beschrieben. Die Umsetzung der Erfindung ist nicht auf die illustrierten Kanalstrukturen zum Beispiel in Chipstrukturen oder in Hohlfasern beschränkt, sondern allgemein auch in anders geformten Kompartimenten realisierbar.

Die erfindungsgemäße Kombination von fokussierenden und ablenkenden Kräften, deren Überlagerung für die zu trennenden Partikel je nach den Partikeleigenschaften zu verschiedenen Gleichgewichtslagen (Strömungspfade- oder abschnitte) in der Flüssigkeitsströmung führen, mit zwei Trenneinrichtungen oder einer kombiniert wirkenden Trenneinrichtung wird unter Bezug auf das bevorzugte Ausführungsbeispiel einer Kombination von Dielektrophorese und Elektrophorese beschrieben. Wenn die ablenkende Kraft wenigstens eine Vektorkomponente in einer Bezugsrichtung (Ablenkrichtung) senkrecht zur Richtung der Flüssigkeitsbewegung im Kanal besitzt, so wirkt die Dielektrophorese von den Wänden des Kanals hin in das Innere des Strömungsquerschnitts der strömenden Flüssigkeit fokussierend, während die Elektrophorese umgekehrt zum äußeren Rand des Strömungsprofils, insbesondere zu Elektroden an den Wänden hin lenkend wirkt. Analog zu den im folgenden erläuterten Prinzipien können andere ablenkende Kräfte verwendet werden. Wenn die ablenkende Kraft hingegen parallel zur Richtung der Flüssigkeitsströmung verläuft, wirkt die Dielektrophorese entlang der Flüssigkeitsströmung fokussierend, wobei durch eine Modulation der dielektrophoretischen Wirkung die Partikel im Elektrophoresefeld verschieden schnell bewegt werden.

Die Figuren 1 und 2 zeigen ausschnittsweise ein erfindungsgemäßes fluidisches Mikrosystem 100 in vergrößerter schematischer Draufsicht und Querschnittsansicht. Das Mikrosystem 100 enthält

einen Kanal 30, der durch die seitlichen Kanalwände 31, 32, den Kanalboden 33 (Draufsicht in Fig. 1) und die Deckfläche 34 begrenzt wird. Auf dem Kanalboden 33 und der Deckfläche 34 sind als Trenneinrichtung Elektroden 40 gebildet. Des weiteren sind Trichterelektroden 51, 52 eines dielektrischen Aufreihlements 50 vorgesehen. Der Aufbau des Mikrosystems 100 und die Ausbildung der Elektroden sowie deren elektrischer Anschluss sind an sich aus der Mikrosystemtechnik bekannt. Der Kanal besitzt beispielsweise eine Breite von rd. 400 μm und eine Höhe von rd. 40 μm (diese Verhältnisse sind in den Figuren nicht maßstäblich dargestellt). Der laterale Elektrodenabstand in den Ebenen des Kanalbodens 33 und der Deckfläche 34 beträgt beispielsweise 70 μm , während der senkrechte Abstand der einander gegenüberliegenden Elektroden entsprechend der Kanalhöhe rd. 40 μm beträgt.

Die Elektroden 40 umfassen gerade Elektrodenstreifen, die sich in Längsrichtung des Kanals 30, d.h. in Strömungsrichtung durch den Kanal erstrecken. Die Elektroden 40 sind in einzelne Elektrodensegmente 41, 42, ... unterteilt. Jeweils eine Gruppe von Elektrodensegmenten bildet einen Elektrodenabschnitt, der separat ansteuerbar ist. Jedes Segment besitzt eine Breite von rund 50 μm und in Strömungsrichtung eine Länge von z. B. 1000 μm . Jeder Elektrodenabschnitt ist mit einer Steuerungseinrichtung 70 verbunden (hier nur für die Elektroden 41, 42 gezeigt).

Die Steuerungseinrichtung 70 ist zur Beaufschlagung der Elektroden 40 mit Spannungen derart eingerichtet, dass die vorbeiströmenden Partikel in einem Elektrodenabschnitt (zum Beispiel 45-48, siehe Figur 2) einer Abstoßung von den Elektroden mittels negativer Dielektrophorese und/oder einer elektrophoretischen Driftbewegung senkrecht zur Strömungsrichtung ausgesetzt werden. Die Steuerungseinrichtung enthält einen Wechselspannungsgenerator 71 und/oder einen Gleichspannungsgenerator 72, die mit den Elektroden verbunden sind. Der Wechselspannungsgenerator 71 kann mit einer Stelleinrichtung ausgestattet sein,

mit der die Amplituden von hochfrequenten Wechselspannungen an den Elektroden eingestellt werden können.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens strömt die Suspensionsflüssigkeit 10 (Trägerflüssigkeit) mit Partikeln 20 durch den Kanal 30. Die Strömungsgeschwindigkeit der Suspensionsflüssigkeit 10, die mit einer Spritzenpumpe eingestellt werden kann, beträgt z. B. 300 $\mu\text{m/s}$. Zuerst erfolgt vorzugsweise eine Aufreihung der Partikel 20 mit dem dielektrischen Aufreih-element 50. Die Trichterelektroden 51, 52 werden beispielsweise mit einer hochfrequenten Wechselspannung ($f = 2 \text{ MHz}$, $U = 20 \text{ V}_{\text{pp}}$) betrieben, um die Partikel 20 auf einen Strömungspfad 11 in der Mitte des Kanals 30 zu fokussieren. Alternativ kann ein hydrodynamisches Aufreih-element vorgesehen sein, bei dem mit zusätzlichen Hüllströmen die Partikel 20 fokussiert werden.

Nach der Aufreihung der Partikel gelangen diese in den Bereich der Elektroden 40. Diese werden beispielsweise alternierend mit einer Wechselspannung und einer Gleichspannung mit einer Taktfrequenz im Bereich von 1 bis 10 Hz angesteuert (Wechselspannung: $f = 2.5 \text{ MHz}$, $U = 20 \text{ V}_{\text{pp}}$, Gleichspannung $U = 50 \text{ V}$, Dauer $t = 80 \mu\text{s}$). Durch Abgleichung der Spannungs- und Frequenzparameter der hochfrequenten Wechselspannung an die Strömungsgeschwindigkeit und die Einstellung der Gleichspannungsparameter (Impulszeit, Spannung und Taktfrequenz) lassen sich die kleineren Partikel innerhalb von wenigen Sekunden um einige 10 μm aus dem ursprünglichen Strömungspfad 11 in einen benachbarten Strömungspfad 12 (siehe Figur 2) herausziehen, während die größeren Partikel im ursprünglichen Strömungspfad 11 verbleiben.

Die auf die Partikel wirkenden Potentiale sind schematisch in Figur 3 illustriert. Zur Elektrophorese wird ein Gleichspannungsfeld erzeugt, das ein quer zum Strömungsquerschnitt abfallendes Potential $P1$ erzeugt. Partikel erfahren im Potential $P1$ eine nach außen gerichtete Kraft (ablenkendes Potential, Ab-

lenkrichtung quer zur Strömungsrichtung). Die Hochfrequenzansteuerung der Elektroden generiert einen entgegengesetzten, nach innen gerichteten, fokussierenden Potentialverlauf P2a oder P2b. Die negative Dielektrophorese basiert auf einer Partikelpolarisation, die sich bei den großen Partikeln stärker auswirkt als bei den kleinen Partikeln. Im Hochfrequenzfeld erfahren daher die großen Partikel 21 das Potential P2a und die kleinen Partikel 22 das flachere Potential P2b. Die Überlagerung der beiden Fälle mit dem fokussierenden Potential P1 ergibt die effektiven Potentiale Pa, Pb entsprechend den durchgezogenen Linien. Während das tiefe Potential P2a durch die Elektrophorese kaum verändert wird, ergibt sich für das flache Potential P2b eine Verschiebung des Potentialminimums aus der Kanalmitte nach außen. Für die großen Partikel sind die dielektrophoretischen, fokussierenden Kräfte so groß, dass sie die elektrophoretische Auslenkung jeweils kompensieren, während dies bei den kleinen Partikeln 21 nicht der Fall ist. Entsprechend bilden sich die getrennten Strömungspfade 11, 12 aus. In den Strömungspfaden 11, 12 können verschiedene Strömungsgeschwindigkeiten gegeben sein. Mit einer laminaren Strömung im Kanal ist die Strömungsgeschwindigkeit nahe der Kanalwand beispielsweise geringer als in der Mitte des Kanals. Erfindungsgemäß können Partikel unterschiedlicher Eigenschaften somit in Bereiche mit verschiedenen Strömungsgeschwindigkeiten fokussiert werden, was die Trennschärfe verbessern kann.

Analoge Effekte ergeben sich bei Partikeln mit verschiedenen relativen Dielektrizitätskonstanten oder mit verschiedenen Nettoladungen, zum Beispiel Oberflächenladungen.

Experimentell wurde die Trennung mit einem Gemisch aus Partikeln 20 gezeigt, die kleinere Partikel 21 mit einem Durchmesser von 1 μm ("Fluospheres"-Sulfatmikrosphären, Molecular Probes) und größere Partikel 22 mit einem Durchmesser von 4.5 μm (Polybeadpolystyren, 17135, Polysciences) umfassen. Als Suspensions-

flüssigkeit wurde die Cytoconlösung I (Evotech Technologies GmbH, Hamburg, Deutschland) verwendet. Da die negative Dielektrophorese auf die kleinen Partikel erheblich schwächer wirkt als auf die großen Partikel, können die kleinen Partikel durch die elektrophoretische Kraft aus dem mittleren Strömungspfad 11 herausgezogen werden.

Die Elektrodenansteuerung erfolgt beispielsweise nach dem folgenden Schema:

Elektroden in Figur 2	Phase der Hochfrequenzwechselspannung	Potential Gleichspannung
47	0°	Masse
48	180°	Impuls
45	0°	Impuls
46	180°	Masse

Alternativ kann die Elektrodenansteuerung beispielsweise nach dem folgenden Schema (rotierendes elektrisches Feld) erfolgen:

Elektroden in Figur 2	Phase der Hochfrequenzwechselspannung	Potential Gleichspannung
47	0°	Masse
48	90°	Impuls
45	270°	Impuls
46	180°	Masse

Zur Illustration der erfindungsgemäßen Kombination der Dielektrophorese mit anderen ablenkenden Kräften zeigt Figur 1 schematisch eine Trenneinrichtung 40A (gestrichelt gezeichnet). Die in oder außerhalb der Kanalwand vorgesehene Trenneinrichtung 40A ist zum Beispiel eine Magneteinrichtung zur Ausübung magnetischer Kräfte, eine Lasereinrichtung zur Ausübung optischer Kräfte analog zum Prinzip des Laser-Tweezers oder eine Schallquelle zur Ausübung mechanischer Kräfte z. B. durch Ultraschall.

Figur 4 zeigt Merkmale von abgewandelten Ausführungsformen der Erfindung. Abweichend von Figur 1 kann vorgesehen sein, dass auch der Strömungspfad 11 von der Mitte des Kanals 30 nach außen verlagert wird, in dem das Potentialminimum der Dielektrophorese durch entsprechende asymmetrische Ansteuerung der Elektroden 40 verschoben wird. Des weiteren kann vorgesehen sein, dass die Strömungspfade 11, 12 in getrennte Kompartimente 35, 36 des Kanals 30 münden, die durch Kanalwände oder (wie illustriert) durch eine elektrische Feldbarriere voneinander getrennt sind. Die elektrische Feldbarriere wird durch mindestens eine Barriere an der Elektrode 60 erzeugt, die sich in Kanalrichtung erstreckt.

Bei der in Figur 5 illustrierten Ausführungsform befinden sich in einem Kanal 30 seitlich an den Kanalwänden 31, 32 und/oder auf der Bodenfläche 33 Elektroden 41, 42 zur Elektrophorese und zentral mindestens eine Elektrode 43 zur Dielektrophorese. Die Elektrode 43 ist in an sich bekannter Weise mit einer elektrisch isolierenden Passivierungsschicht 43a versehen. Die Passivierungsschicht 43a hat zwei Funktionen. Erstens verhindert sie einen Feldverlust des Gleichstromfeldes für die Elektrophorese, zweitens verhindert sie ein permanentes Anlagern und damit ggf. verbundenes Denaturieren von Partikeln oder elektrochemische Reaktionen an den Elektroden. Die Elektroden 41, 42 und 43 sind jeweils mit einer Gleichspannungsquelle und einer Wechselspannungsquelle verbunden.

Optional kann der Kanalrand durch poröse Materialien (z. B. Hohlfasern) realisiert werden. Damit ist es möglich, zusätzliche externe chemische Gradienten aufzuprägen (z.B. ein pH-Profil). Des Weiteren können die mindestens eine Elektrode 43 und die Elektroden 41, 42 zur Elektrophorese in Strömungsrichtung versetzt angeordnet sein.

Zur Partikeltrennung werden eingespülte Mikroobjekte (zum Beispiel Makromoleküle) durch positive Dielektrophorese zu der zentralen Elektrode 43 gezogen. Simultan oder bei wechselweiser Ansteuerung der Elektroden werden die Mikroobjekte durch Elektrophorese zum Rand des Kanals 30 gezogen. Die Trennung basiert auf den oben beschriebenen Prinzipien einer verschieden starken Auswirkung der Kombination von Dielektrophorese und Elektrophorese auf die verschiedenen Partikel.

Alternativ kann mit der Anordnung gemäß Figur 5 die folgende Prozedur realisiert werden. Durch Dielektrophorese werden die Partikel zunächst an der zentralen Elektrode 43 gesammelt. Anschließend wird die laterale Strömung 10 durch den Kanal 30 gestoppt und eine Trennung der Mikroobjekte über Elektrophorese durchgeführt. Nach der elektrophoretischen Trennung in verschiedene Strömungspfade wird die Strömung 10 fortgesetzt. Der wesentliche Vorteil der erfindungsgemäß während der Elektrophorese optional vorgesehen Unterbrechung des Strömungstransports durch den Kanal besteht darin, dass eine erhöhte Trennschärfe der Elektrophorese durch die vorher definierten Startbedingungen erreicht werden kann.

Wenn mehrere, ggf. passivierte Elektroden 43.1 bis 43.5 zur Dielektrophorese vorgesehen sind, ergibt sich der in Figur 6 gezeigte Aufbau. Im Kanal 30 befinden sich dreidimensional angeordnet an den Seitenwänden die Elektroden 41, 42 für die Elektrophorese und auf der Bodenfläche die Elektroden 43.1 bis 43.5 zur Dielektrophorese (elektrische Zuführungen nicht dargestellt). Auf der Deckfläche (nicht dargestellt) befinden sich Dielektrophorese-Elektroden in gleicher Zahl und Anordnung wie die Elektroden 43.1 bis 43.5. Die Elektroden 43.1 bis 43.5 werden mit Signalen beaufschlagt, die zwischen benachbarten Elektroden (zum Beispiel 43.1, 43.2) um 180° phasenverschoben sind und für übereinanderliegende Elektroden (zum Beispiel 43.1 und gegenüberliegende Elektrode auf der Deckfläche) phasengleich

sind. Die mit der Strömung 10 eingespülten Partikel 20 umfassen zum Beispiel zwei Typen, von denen ein Typ nicht durch Elektrophorese angesprochen wird. Die Partikel 20 ordnen sich dielektrophoretisch (negative Dielektrophorese) zunächst im Zwischenraum der übereinander stehenden Elektroden an (in Aufsicht verdeckt). Erst beim Passieren des elektrophoretischen Feldes werden die Partikel des einen Typs ausgelenkt, während der andere Typ unbeeinflusst bleibt.

Bei der Ausführungsform gemäß Figur 7 sind ebenfalls viele, ggf. passivierte Elektroden 43.1 bis 43.11 zur Dielektrophorese zwischen den Elektroden 41, 42 zur Elektrophorese angeordnet. Auf der Deckfläche (nicht dargestellt) befinden sich Dielektrophorese-Elektroden in gleicher Zahl und Anordnung wie die Elektroden 43.1 bis 43.11. Das erste Dielektrophorese-Elektrodenpaar 43.1, 43.2 ist zur Erhöhung der Trennschärfe mit einem dielektrischen Aufreihenelement 50 versehen. Im Unterschied zu den oben beschriebenen Ausführungsformen ist in Figur 7 das Gleichspannungs-Elektrophoresefeld (Ablenkrichtung) parallel zur Strömungsrichtung der Flüssigkeit 10 (siehe Pfeil) durch das Kompartiment 30 ausgerichtet.

Bei Ansteuerung des Dielektrophorese-Elektroden-Arrays mit 180°-Phasenverschiebung zwischen benachbarten und gegenüberliegenden Elektroden oder mit 90°-Phasenverschiebung ordnen sich die Partikel 20 zwischen den Elektroden an (negative Dielektrophorese). Die Dielektrophorese-Elektroden bilden ein periodisches i. A. asymmetrisches moduliertes Potential, dem das Elektrophoresepotential zwischen den Elektroden 41, 42 überlagert wird. Die asymmetrische Modulation der Dielektrophoresefelder bedeutet, dass zwischen benachbarten Elektrodenstreifen des Arrays 43.1 bis 43.11 wechselweise höhere oder geringere Feldstärken eingestellt sind. Das Elektrophoresepotential zwischen den Elektroden 41, 42 wird nicht zeitlich konstant gehalten, sondern periodisch oder zufällig geschaltet. Damit lässt

sich eine hochempfindliche Auftrennung nach dem Prinzip der sogenannten Brown'schen Ratsche ("Brownian ratchet" oder Rüttelratsche, siehe H. Linke et al. Physikalische Blätter Bd. 56, Nr. 5, 2000, S. 45-47) realisieren. In der Brown'schen Ratsche hängt die Wandergeschwindigkeit von Partikeln durch Brown'sche Bewegung stark von der Partikelgröße ab. Die Trennung erfolgt in verschiedene Strömungsabschnitte in Strömungsrichtung je nach den verschiedenen Wandergeschwindigkeiten der Partikel. Ein besonderer Vorteil dieser Prozedur besteht darin, dass sich die Trennung über mehrere einstellbare Parameter durch die Überlagerung der Brown'schen Bewegung, der Elektrophorese und der Dielektrophorese empfindlich steuern lässt. Diese Ausführungsform der Erfindung ist besonders für die Molekülseparation geeignet (z.B. Trennung von DNS-Molekülen oder DNS-Fragmenten, die in physiologischer Umgebung alle negativ geladen sind).

Bei Mischpopulation differierender Ladungen (+/-) sollte der Eingangskanal mit dem Aufreihement 50 mittig zum Array der Dielektrophorese-Elektroden liegen, damit Objekte unterschiedlicher Ladung in elektrophoretisch in verschiedene Richtungen bewegt werden. In planaren Strukturen lassen sich ebenfalls asymmetrische Potential für positive Dielektrophorese realisieren, z. B. durch Aufbringung asymmetrischer, also relativ zur Kanallängsrichtung zum Beispiel verschieden dicker Passivierungsschichten.

Figur 8 illustriert wie die Figur 2 eine Querschnittsansicht eines fluidischen Mikrosystems 100 mit vier Elektroden 45-48. Mit diesen Elektroden wird ein fokussierendes Potential erzeugt, dessen Potentialminimum in der Kanalmitte liegt. Gleichzeitig wird analog zu Figur 3 ein erstes, in x-Richtung wirkendes elektrisches Potential für eine elektrophoretische Feldwirkung und zusätzlich in y-Richtung ein Magnetfeldgradient zur Bildung eines zweiten ablenkenden Potentials erzeugt. Der Magnetfeldgradient wird mit einem magnetfelderzeugenden Element 49

gebildet, das zum Beispiel einen Permanentmagneten oder einen von der Flüssigkeit isolierten, stromdurchflossenen Leiter umfasst. Abweichend von der dargestellten Ausführungsform kann das magnetfelderzeugende Element mit einem Abstand vom Kanal angeordnet sein.

Während sich die Partikel in z-Richtung durch den Kanal bewegen, erfahren sie eine Ablenkung in beide x- und y-Raumrichtungen, deren Stärke von den dielektrischen und magnetischen Eigenschaften der zu trennenden Partikel abhängt. Diese Ausführungsform der Erfindung wird bspw. zur Trennung latexumhüllter, superparamagnetischer Partikel mit dem Ziel der Gewinnung von Fraktionen mit hoher Monodispersität angewendet.

Die Kurvendarstellung in Figur 9 illustriert die auf das jeweilige Volumen normierte, dielektrophoretische Kraft f_{diel} , die auf einen Partikel im Wechselfeld wirkt, in Abhängigkeit von der Frequenz des Wechselfeldes. Die Simulationsergebnisse beziehen sich auf Latexbeads mit Durchmessern von 0,5 μm , 1 μm , 2 μm und 5 μm (Kurven von oben) mit einer Leitfähigkeit von 0.7 mS/m und $\text{DK} = 3.5$ in Wasser. Die symbolisch illustrierten Elektroden sind analog zu Figur 1 angeordnet und werden alternierend oder überlagert mit einem Signal beaufschlagt, das Frequenzanteile unterhalb 100 kHz und oberhalb 1 MHz enthält. Die nieder- und höherfrequenten Signalanteile werden beispielsweise mit im zeitlichen quadratischen Mittel gleichen Amplituden, jedoch verschiedenen, in den Bildeinschüben illustrierten Phasenbeziehungen erzeugt. Das höherfrequente Signal fokussiert die Partikel durch negative Dielektrophorese hin zur Kanalmitte. Das niederfrequente Signal hingegen wirkt in Abhängigkeit von der Partikelgröße durch positive oder negative Dielektrophorese, die sich mit der fokussierenden Wirkung des höherfrequenten Signals überlagert. Die kleineren Partikel werden im Ergebnis nach links oben abgelenkt, während die größeren Partikel (z. B. 5 μm) sich auf einer Diagonallinie rechts unten sammeln. Ent-

sprechend gelangen Partikel mit unterschiedlichen Größen in verschiedene Strömungspfade innerhalb der Strömung durch den Kanal.

Die in der vorstehenden Beschreibung, den Zeichnungen und Ansprüchen offenbarten Merkmalen der Erfindung können sowohl einzeln als auch in Kombination für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausgestaltungen von Bedeutung sein.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Trennung von Partikeln (20, 21, 22) in einem Kompartiment (30) eines fluidischen Mikrosystems (100), mit den Schritten:

- Bewegung einer Flüssigkeit (10), in der Partikel (20, 21, 22) suspendiert sind, mit einer vorbestimmten Strömungsrichtung durch das Kompartiment (30), und
- Erzeugung eines ablenkenden Potentials, in dem mindestens ein Teil der Partikel (20, 21, 22) relativ zur Flüssigkeit in eine Ablenkrichtung bewegt wird,

gekennzeichnet durch die weiteren Schritte:

- Erzeugung mindestens eines fokussierenden Potentials, so dass unter der Wirkung von hochfrequenten elektrischen Feldern mindestens ein Teil der Partikel relativ zur Flüssigkeit durch Dielektrophorese entgegengesetzt zur Ablenkrichtung bewegt wird, und
- Lenkung von Partikeln mit verschiedenen elektrischen, magnetischen oder geometrischen Eigenschaften in verschiedene Strömungsbereiche (11, 12) in der Flüssigkeit.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die Ablenkrichtung von der Strömungsrichtung abweicht und eine Komponente quer zur Strömungsrichtung aufweist.

3. Verfahren nach Anspruch 2, bei dem die Ablenkrichtung senkrecht zur Strömungsrichtung hin zu mindestens einer der seitlichen Wänden des Kompartiments verläuft, das ablenkende Potential durch elektrische, magnetische, optische, thermische und/oder mechanische Kräfte erzeugt wird, und die Strömungsbereiche Strömungspfade (11, 12) umfassen, die verschiedenen Potentialminima entsprechen, die für die jeweiligen Partikel durch die Überlagerung der ablenkenden und fokussierenden

Potentiale während des Durchtritts durch das Kompartiment im zeitlichen Mittel gebildet werden.

4. Verfahren nach Anspruch 3, bei dem das ablenkende Potential durch ein Gleichspannungsfeld gebildet wird, unter dessen Wirkung die Partikel durch Elektrophorese zu mindestens einer der seitlichen Wände des Kompartiments (30) gezogen werden.

5. Verfahren nach Anspruch 4, bei dem die Partikel biologische Zellen umfassen, von denen zumindest ein Teil unter der Wirkung des Gleichspannungsfeldes lysiert werden.

6. Verfahren nach Anspruch 3, bei dem die Flüssigkeit (10) eine Suspension biologischen Materials umfasst, das biologische Zellen und Zellbestandteile enthält, wobei unter der Wirkung des Gleichspannungsfeldes eine Trennung der Zellen von den Zellbestandteilen erfolgt.

7. Verfahren nach Anspruch 4, bei dem an Wänden (31-34) des Kompartiments (30) Elektroden (40) angeordnet sind, die mit elektrischen Feldern zur Erzeugung der Dielektrophorese und der Elektrophorese beaufschlagt werden.

8. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die ablenkenden und fokussierenden Potentiale zeitlich abwechselnd in mindestens einem Abschnitt des Kompartiments (30) oder geometrisch abwechselnd in verschiedenen, aufeinander folgenden Abschnitten des Kompartiments (30) erzeugt werden.

9. Verfahren nach den vorhergehenden Ansprüchen 5 und 6, bei dem die elektrischen Felder hochfrequente Wechselspannungsanteile und Gleichspannungsanteile umfassen, die gleichzeitig oder alternierend erzeugt werden.

10. Verfahren nach Anspruch 7, bei dem mit einem Elektroden-Array (43.1 bis 43.11) zwischen den zwei Elektroden (41, 42) eine Vielzahl fokussierender Potentiale erzeugt werden, wobei die Partikel je nach ihren elektrischen oder geometrischen Eigenschaften auf die verschiedenen Strömungspfade (11, 12) gelenkt werden.
11. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche 2 bis 9, bei dem die Partikel (20, 21, 22) auf mindestens zwei getrennte Strömungspfade (11, 12) gelenkt werden.
12. Verfahren nach Anspruch 11, bei dem die mindestens zwei Strömungspfade (11, 12) in weitere, getrennte Kompartimente (35, 36) des Mikrosystems (100) münden.
13. Verfahren nach Anspruch 12, bei dem die mindestens zwei Strömungspfade (11, 12) in getrennte Kompartimente (35, 36) des Mikrosystems (100) münden, die durch Kompartimentwände oder elektrische Barrieren (60) getrennt sind.
14. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die Ablenkrichtung parallel zur Strömungsrichtung verläuft und mehrere fokussierende Potentiale erzeugt werden, die parallel zur Ablenkrichtung asymmetrisch moduliert sind und in denen die Partikel das ablenkende Potential verschieden schnell durchlaufen.
15. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Partikel (20, 21, 22) vor den Elektroden an einem dielektrophoretischen oder hydrodynamischen Aufreihement (50) vorbeiströmen.
16. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem im Kanal (30) ein pH-Gradient erzeugt wird.

17. Verfahren nach Anspruch 16, bei dem der pH-Gradient durch elektrische Gleichspannungsfelder erzeugt wird, die zur elektrophoretischen Trennung der Partikel vorgesehen sind.

18. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem nach der Lenkung der Partikel auf die verschiedenen Strömungspfade (11, 12) eine Detektion der Partikel erfolgt.

19. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das ablenkende und das fokussierende Potential durch mehrere überlagerte Wechselspannungen mit verschiedenen Frequenzen gebildet werden.

20. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem mindestens zwei ablenkende Potentiale mit verschiedenen Ablenkrichtungen erzeugt werden.

21. Fluidisches Mikrosystem, mit:

- mindestens einem Kompartiment (30), das von einer Flüssigkeit mit Partikeln (20, 21, 22) in einer vorbestimmten Strömungsrichtung durchströmt wird, und
- einer ersten Trenneinrichtung zur Erzeugung eines ablenkenden Potentials, in dem die Partikel (20, 21, 22) in eine Ablenkrichtung bewegt werden,

gekennzeichnet durch

- eine zweite Trenneinrichtung mit Elektroden (40) zur Erzeugung mindestens eines fokussierenden Potentials, so dass die Partikel durch Dielektrophorese entgegengesetzt zur Ablenkrichtung bewegt werden.

22. Mikrosystem nach Anspruch 21, bei dem die Ablenkrichtung von der Strömungsrichtung abweicht.

23. Mikrosystem nach Anspruch 21 oder 22, bei dem die erste Trenneinrichtung zur Erzeugung elektrischer, magnetischer, optischer und/oder mechanischer Kräfte eingerichtet ist.
24. Mikrosystem nach Anspruch 23, bei dem die erste Trenneinrichtung Elektrophorese-Elektroden, eine Magnetfeldeinrichtung, einen Laser oder eine Ultraschallquelle umfasst.
25. Mikrosystem nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche 21 bis 24, bei dem die ersten und zweiten Trenneinrichtungen getrennt in verschiedenen, aufeinander folgenden Abschnitten des Kompartiments (30) angeordnet sind.
26. Mikrosystem nach Anspruch 21, 23 oder 25, bei dem die ersten und zweiten Trenneinrichtungen eine gemeinsame Ablenkeinheit bilden, die die Elektroden (40) umfasst.
27. Mikrosystem nach Anspruch 26, bei dem die Ablenkeinheit zeitlich abwechselnd mit Wechsel- und Gleichspannungen ansteuerbar ist.
28. Mikrosystem nach Anspruch 24, bei dem zwischen den Elektrophorese-Elektroden (41, 42) ein Elektroden-Array (43.1 bis 43.11) aus Elektrodenstreifen angeordnet ist, die einzeln mit hochfrequenten Wechselspannungen ansteuerbar sind.
29. Mikrosystem nach Anspruch 21, bei dem die Ablenkrichtung parallel zur Strömungsrichtung verläuft.
30. Mikrosystem nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche 21 bis 29, bei dem die Elektroden (40) an Innenseiten der Wände des Kompartiments (30) angeordnet sind.

31. Mikrosystem nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche 21 bis 30, bei dem das Kompartiment (30) in getrennte Kompartimente (35, 36) des Mikrosystems (100) mündet.

32. Mikrosystem nach Anspruch 31, bei dem die Kompartimente (35, 36) des Mikrosystems (100) durch Kompartimentwände oder elektrische Barrieren (60) getrennt sind.

33. Mikrosystem nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche 21 bis 32, bei dem im Kompartiment (30) vor den Trenneinrichtungen ein dielektrophoretisches oder hydrodynamisches Aufreihement (50) angeordnet ist.

1/4

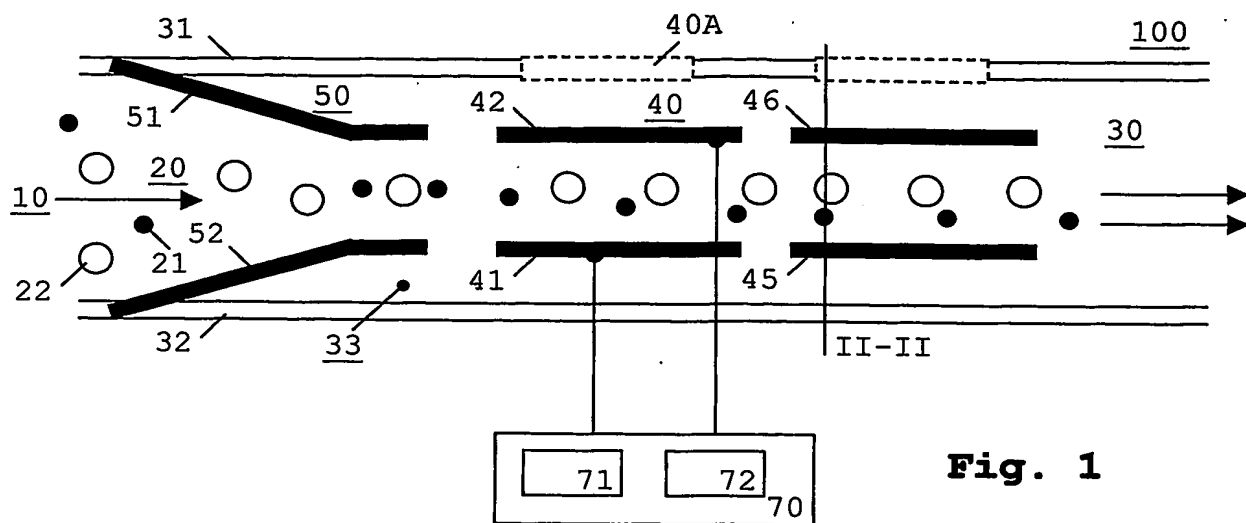


Fig. 1

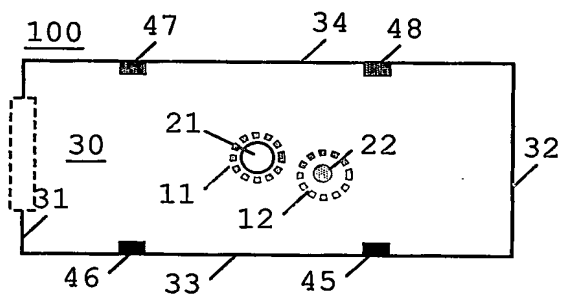


Fig. 2

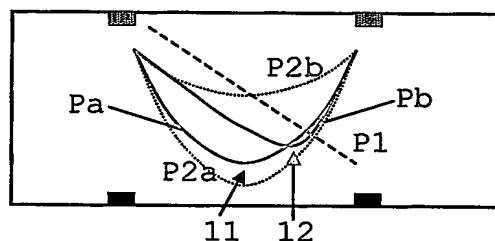


Fig. 3

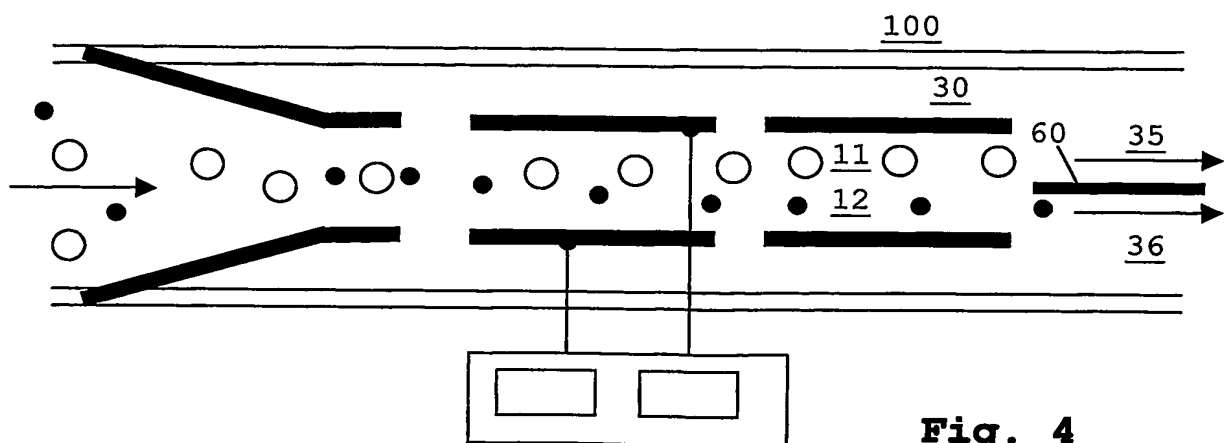


Fig. 4

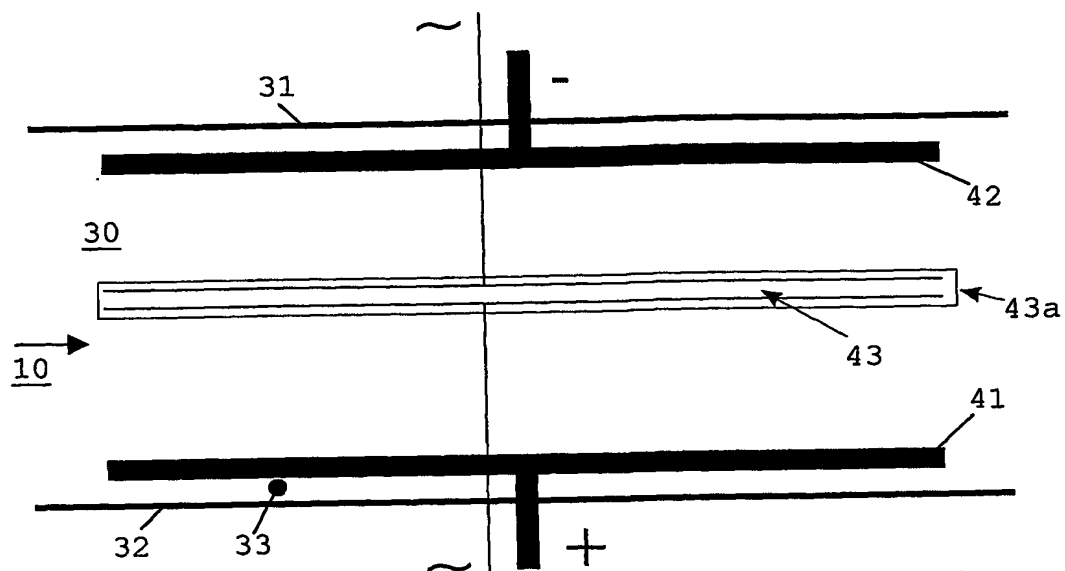


Fig. 5

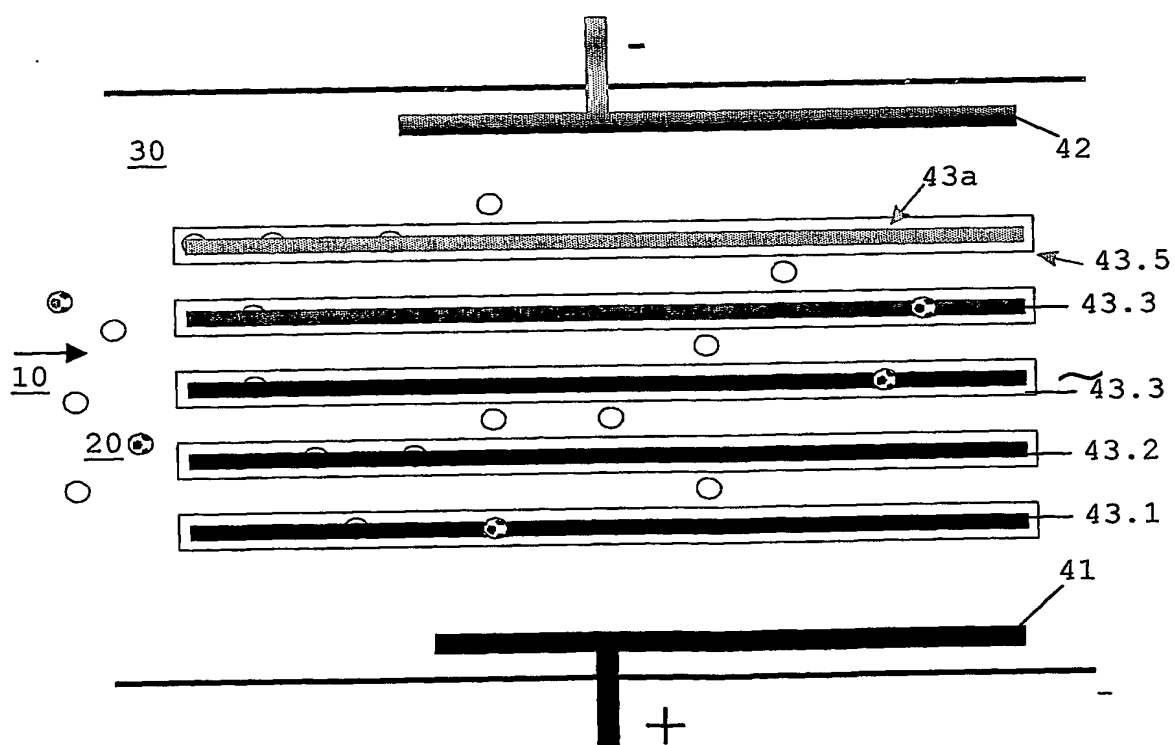


Fig. 6

3/4

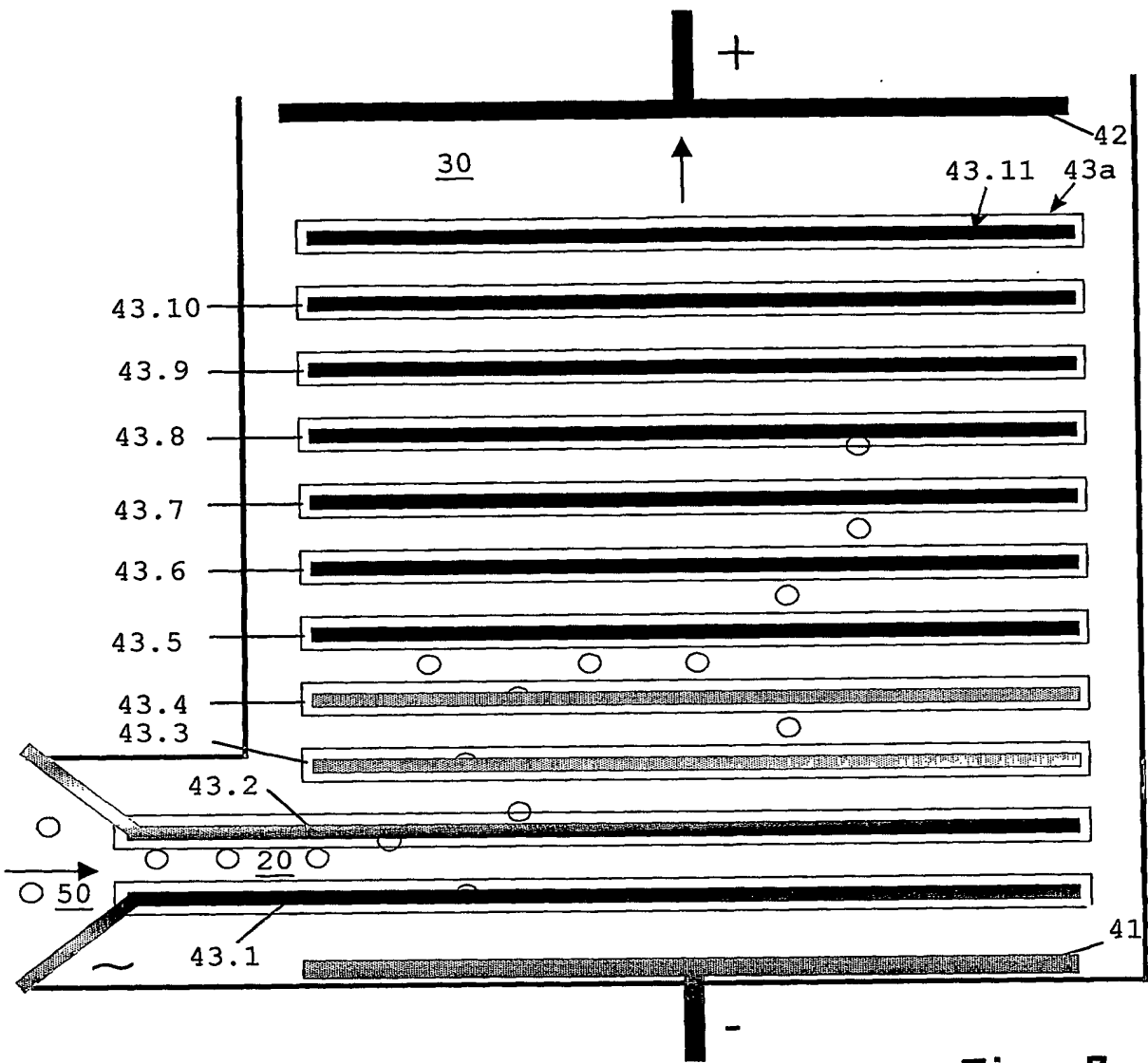


Fig. 7

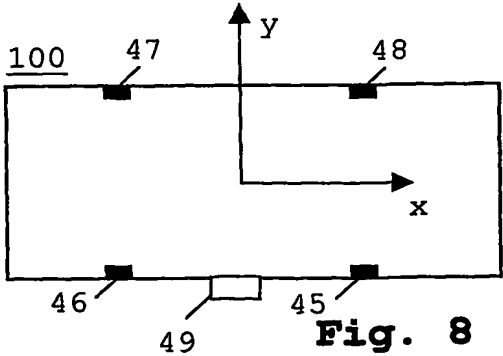


Fig. 8

4/4

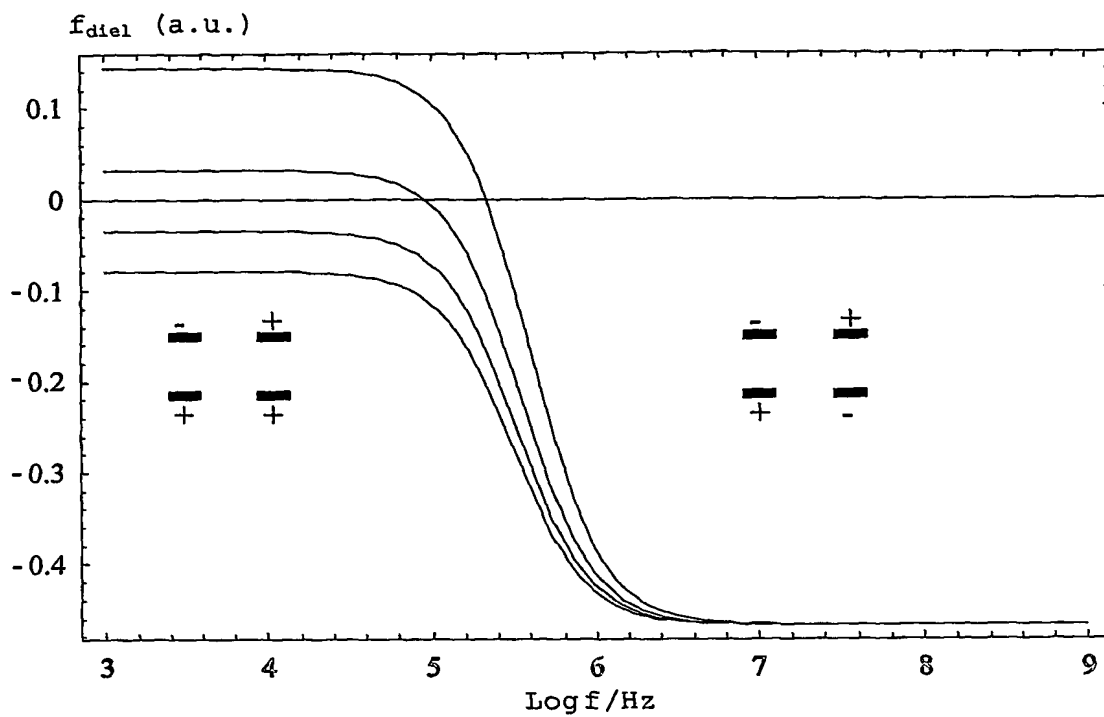
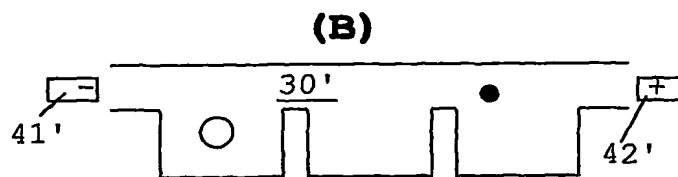
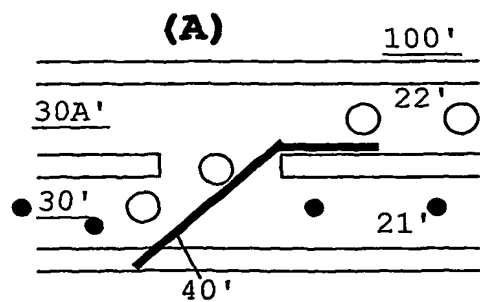


Fig. 9

Fig. 10
(Stand der Technik)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/002774

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 B03C5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 B03C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 199 52 322 A (EVOTEC BIOSYSTEMS AG) 17 May 2001 (2001-05-17) column 6, lines 6-22; claim 1 -----	1-33
X	US 5 454 472 A (HAGEDORN ROLF ET AL) 3 October 1995 (1995-10-03) abstract; figure 2 column 6, lines 1-25 -----	1-33
X	WO 00/00292 A (HAGEDORN ROLF ; FUHR GUENTER (DE); MUELLER TORSTEN (DE); SCHNELLE THOM) 6 January 2000 (2000-01-06) page 26; figures 13-15 -----	1-3, 6-13, 15, 18-23, 25, 26, 28-33

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 July 2004

Date of mailing of the international search report

14/07/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Durville, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/002774

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19952322	A	17-05-2001	DE 19952322 A1	17-05-2001
			WO 0131315 A1	03-05-2001
			EP 1226419 A1	31-07-2002
<hr/>				
US 5454472	A	03-10-1995	DE 4127405 A1	25-02-1993
			DE 4143573 C2	04-07-1996
			WO 9303850 A1	04-03-1993
			DE 59207522 D1	19-12-1996
			DE 59209969 D1	14-11-2002
			EP 0599957 A1	08-06-1994
			EP 0718038 A2	26-06-1996
			JP 6509745 T	02-11-1994
			JP 3453136 B2	06-10-2003
<hr/>				
WO 0000292	A	06-01-2000	DE 19853658 A1	31-05-2000
			DE 19860117 A1	13-07-2000
			AT 253983 T	15-11-2003
			AT 253410 T	15-11-2003
			DE 59907639 D1	11-12-2003
			DE 59907733 D1	18-12-2003
			WO 0000292 A1	06-01-2000
			WO 0000293 A1	06-01-2000
			EP 1089823 A1	11-04-2001
			EP 1089824 A1	11-04-2001
			JP 2002519176 T	02-07-2002
			US 6749736 B1	15-06-2004
			WO 0000816 A1	06-01-2000
			EP 1092144 A1	18-04-2001
			JP 2002519183 T	02-07-2002
			US 6465225 B1	15-10-2002
<hr/>				

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/002774

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 B03C5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 B03C

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 199 52 322 A (EVOTEC BIOSYSTEMS AG) 17. Mai 2001 (2001-05-17) Spalte 6, Zeilen 6-22; Anspruch 1 -----	1-33
X	US 5 454 472 A (HAGEDORN ROLF ET AL) 3. Oktober 1995 (1995-10-03) Zusammenfassung; Abbildung 2 Spalte 6, Zeilen 1-25 -----	1-33
X	WO 00/00292 A (HAGEDORN ROLF ; FUHR GUENTER (DE); MUELLER TORSTEN (DE); SCHNELLE THOM) 6. Januar 2000 (2000-01-06) Seite 26; Abbildungen 13-15 -----	1-3, 6-13, 15, 18-23, 25, 26, 28-33



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

7. Juli 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

14/07/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Durville, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/002774

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19952322 A	17-05-2001	DE 19952322 A1	17-05-2001
		WO 0131315 A1	03-05-2001
		EP 1226419 A1	31-07-2002
US 5454472 A	03-10-1995	DE 4127405 A1	25-02-1993
		DE 4143573 C2	04-07-1996
		WO 9303850 A1	04-03-1993
		DE 59207522 D1	19-12-1996
		DE 59209969 D1	14-11-2002
		EP 0599957 A1	08-06-1994
		EP 0718038 A2	26-06-1996
		JP 6509745 T	02-11-1994
		JP 3453136 B2	06-10-2003
WO 0000292 A	06-01-2000	DE 19853658 A1	31-05-2000
		DE 19860117 A1	13-07-2000
		AT 253983 T	15-11-2003
		AT 253410 T	15-11-2003
		DE 59907639 D1	11-12-2003
		DE 59907733 D1	18-12-2003
		WO 0000292 A1	06-01-2000
		WO 0000293 A1	06-01-2000
		EP 1089823 A1	11-04-2001
		EP 1089824 A1	11-04-2001
		JP 2002519176 T	02-07-2002
		US 6749736 B1	15-06-2004
		WO 0000816 A1	06-01-2000
		EP 1092144 A1	18-04-2001
		JP 2002519183 T	02-07-2002
		US 6465225 B1	15-10-2002